水涝胁迫下辣椒转录组特征分析及 EST-SSR 标记开发

田怀志[1]，郭豪[1]，田浩[2]，熊兴伟[1]，张素勤[1]，耿广东[1,3*]
（1. 贵州大学 农学院，贵阳 550025；2. 遵义市农业科学研究院，贵州 遵义 563000；3. 贵州大学辣椒产业技术研究院，贵阳 550025）

摘　要：为开发适当的生物学工具以探索辣椒对水涝胁迫应答的分子机制，该文对不同淹水处理的辣椒样本进行转录组分析，获得了丰富的序列数据，并在此基础上对 SSR 分子标记进行挖掘。结果表明：（1）辣椒转录组检测共获得 128 939 条 Unigene，其总全长与均长以及 GC 含量分别是 55 082 725 bp、1 101 bp 和 40.57%。与七大功能数据库进行比较，分别有 102 123（NR：79.20%）、110 157（NT：85.43%）、70 203（SwissProt：54.45%）、73 539（KOG：57.03%）、77 646（KEGG：60.22%）、77 442（GO：60.06%）以及 68 216（Pfam：52.91%）个 Unigene 获得功能注释。发现脂质代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、环境适应、次级代谢物生物合成、信号转导和翻译等途径在辣椒水涝胁迫应答中起重要作用。(2）从辣椒转录组数据中发掘到 26 574 个 SSR 位点分布在 24 889 个 Unigene 中。SSR 的出现频率为 20.61%，其中单核苷酸重复所占比例(37.26%)最高，其次是三核苷酸(31.00%）和二核苷酸（25.44%）重复类型，三者占 EST-SSR 总数的 93.70%。在单核苷酸与二核苷酸中最多的基序类型为 A/T、AG/CT 和 TC/GA，然后是 AT 和 TA；三核苷酸中最常见的基序类型是 TTG/CAA 和 ACA/TGT。(3）用 Primer 3 设计了 EST-SSR 引物 10 002 对，随机选择 30 对引物进行 PCR 扩增，均可获得有效扩增。通过 3 份辣椒材料进行扩增，其中 7 对引物可以扩增出目标条带。综上所述，在辣椒中优势 SSR 重复类型的基序结构和其他品种基本相近，并初步探索了辣椒水涝胁迫应答的分子机制，开发了 EST-SSR 标记，为辣椒耐涝遗传育种提供参考。

关键词：辣椒，水涝胁迫，响应机制，转录组，EST-SSR
中图分类号：Q943　　　　　　　　　　**文献标识码**：A

Transcriptome characteristics analysis and EST-SSR marker development of *Capsicum annuum* under waterlogging stress

TIAN Huaizhi[1], GUO Hao[1], TIAN Hao[2], XIONG Xingwei[1], ZHANG Suqin[1], GENG Guangdong[1, 3*]
（1. *College of Agriculture, Guizhou University,* Guiyang 550025, China; 2. *Zunyi Acadamy of Agricultural Sciences,* Zunyi 563000, Guizhou, China; 3. *Industrial Technology Institute of Pepper, Guizhou University*, Guiyang 550025, China）

Abstract: SSR molecular markers were obtained based on abundant transcriptome data under different waterlogging conditions in order to develop appropriate biological tools and explore the molecular mechanism of hot pepper response to waterlogging stress in this experiment. The results were as follows: (1) A total of 128 939 Unigenes were obtained from transcriptome analysis of hot pepper. The total length, average length, and GC content were 55 082 725 bp, 1 101 bp, and 40.57%, respectively. Compared with seven major functional databases, 102 123 (NR: 79.20%), 110 157 (NT: 85.43%), 70 203 (SwissProt: 54.45%), 73 539 (KOG: 57.03%), 77 646 (KEGG: 60.22%), 77 442 (GO: 60.06%), and 68 216 (Pfam: 52.91%) Unigenes obtained functional annotations. It was found that lipid metabolism, carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, environmental adaptation, secondary metabolite biosynthesis, signal transduction, and translation play important roles in the response to waterlogging stress. (2) 26 574 SSR loci were found in 24 889 Unigenes from hot pepper transcriptome data. The frequency of SSR was 20.61%, of which single nucleotide repeat accounted for the highest ratio (37.26%), followed by trinucleotide (31.00%) and dinucleotide (25.44%) repeat types, accounting for 93.70% of the total EST-SSR. The motifs A/T, AG/CT, and TC/GA, followed by AT and TA, were the most abundant in single

基金项目：国家自然科学基金（32260760）；贵州省科技计划资助项目（2022050, 20201Z002, 2021063, 20202102）；贵州省农业农村厅资助项目(黔财农[2022]89 号)[Supported by National Natural Science Foundation of China (32260760); Science and Technology Program of Guizhou Province (2022050, 20201Z002, 2021063, 20202102); Project from Department of Agriculture and Rural Affairs of Guizhou Province (202289)].
第一作者：田怀志（1996-），硕士研究生，研究方向为蔬菜生理生态与生物技术研究，（E-mail）zhihuaitian@163.com。
*通信作者：耿广东，博士，教授，研究方向为蔬菜生理生态与生物技术研究，（E-mail）genggd213@163.com。

nucleotide and dinucleotide. The most common types of trinucleotides were TTG/CAA and ACA/TGT. (3) 10 002 pairs of EST-SSR primers were designed with Primer 3. 30 pairs of primers were randomly selected for amplification test, and all of them were effective. Seven pairs of primers could amplify the target bands in three hot pepper germplasms. To sum up, the motif structure of the most dominant SSR repeat type in hot pepper was basically similar to that of other varieties, and the molecular mechanisms of hot pepper waterlogging stress response were preliminarily explored. The EST-SSR markers were developed to provide reference for hot pepper waterlogging-tolerant genetics and breeding.
Key words: *Capsicum annuum*(hot pepper), waterlogging stress, response mechanism, transcriptome, EST-SSR

辣椒（*Capsicum annuum*）作为世界上第二大茄科蔬菜，是我国种植面积最大的蔬菜（邹学校等，2020），并且伴随着辣椒用途的不断开发和加工型产业的快速发展，其已成为我国乡村振兴的重要支柱产业之一。但是，辣椒属于浅根系作物，根系不发达，再生能力弱，耐涝能力差。长江中下游地区涝害频繁发生，导致辣椒减产减收严重（刘周斌等，2015）。目前，辣椒耐涝胁迫方面的研究较少，并主要集中于生理方面，对其分子机理研究则是更少。耐涝是受多基因控制的性状，难以定位，仅基于表型很难快速地将这些性状加以利用。利用分子标记进行预选可减少群体规模，并可在辣椒生长早期筛选出理想的基因型，可加速辣椒新品种培育进程。

转录组测序（RNA-seq）技术是利用高通量测序进行基因表达水平分析，可以反映基因的转录水平，能快速有效地获得基因序列。由于其高通量、准确性和可重复性等优点，现已被广泛应用到分子生物学领域。RNA-seq技术加速了新基因表达模式和功能的分析（Jain et al., 2016），是分析生物体基因表达量变化的重要工具（Zhang et al., 2017），对非模式植物的基因挖掘和分子标记开发均具有重要意义，是探究植物耐涝分子机制的有力工具。Kinga 等（2021）对两个耐涝性不同的黄瓜品种进行转录组分析，发现在耐涝品种中所鉴定的基因与增强糖酵解、氨基酸代谢和不定根发育相关。Xu 等（2017）对黄瓜转录组进行分析，发现耐涝植株表现出更高的碳水化合物代谢以及三磷酸腺苷和还原型辅酶 I 的再生，以应对水涝胁迫带来的能量危机。Pimprapai 等（2011）研究了两个不同耐涝性豌豆品种的分子响应变化，通过根的转录组研究发现能量代谢通路、激素、细胞壁修饰、膜转运蛋白和过氧化物酶相关的多个差异表达基因可能有助于豌豆的耐涝性。Li 等（2022）通过转录组分析发现耐涝猕猴桃根系通过调节碳水化合物和氨基酸代谢来应对水涝胁迫。另外，通过对转录组数据的挖掘，可获得 SSR 位点分布特征，为 SSR 引物设计与筛选提供依据（叶鹏等，2019）。

SSR 因其具有丰富的数量、较高的多态性、良好的重复性以及具有共显性等优点而被广泛应用（罗冉等，2010），但 SSR 标记的开发需要经过构建文库、筛选和测序等工作，既昂贵又繁琐。如今，大规模开展的 cDNA 测序工作以及飞速发展的生物信息学，使得 EST（expressed sequence tag）为 SSR 标记的开发提供了一种经济、方便的方法。随着测序技术的迅速发展，EST 数量逐步增加，使得 EST-SSR 标记越来越丰富。EST-SSR 和传统 SSR 相比具有开发便宜、共显性、稳定、通用性好等优点，可广泛应用于基因标记（Varshney et al., 2005；姜春芽等，2009）。现已在木瓜（伍越等，2021）、香合欢（安琪等，2022）、黄精（陈友吾等，2020）、龙眼（胡文舜等，2019）、川芎（袁灿等，2017）、红麻（万雪贝等，2017）、枫香（李辉等，2022）等植物上开发与应用，并广泛应用于分子标记辅助育种、基因定位、遗传多样性分析和遗传连锁图谱的构建等研究。目前，有些研究者基于公共数据库或转录组有限的辣椒 EST 序列开发了一些引物，并在实践中得到了应用（傅鸿妃等，2018；管俊娇等，2019），但辣椒可公开获得的 SSR 标记有限（Huang et al., 2000），已公开报道可利用的 SSR 标记仅有 500 多个（李永平等，2016），开发数量偏少，难以适应辣椒高密度作图的要求，亟需开发更多的 SSR 标记来丰富遗传图谱构建、种质鉴定以及分子辅助育种等。

本研究在水涝胁迫下从耐涝辣椒转录组数据中检测差异表达基因（DEG），并对其进行组装与功能注释；通过转录组测序技术获得丰富的辣椒 SSR 位点信息，进行辣椒 EST-SSR 引物设计，随后采用 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳技术筛选出多态性好、稳定的辣椒 EST-SSR 引物，并通过对不同辣椒品种的遗传多样性分析以验证引物的应用效果，以期探索辣椒对水涝胁迫应答的分子机制以及辣椒 EST-SSR 位点的分布及序列特征，开发辣椒多态性 EST-SSR 引物；为今后辣椒遗传图谱构建、种质资源评价、系统进化分析、功能基因标记和分子辅助育种等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究材料为'ZHC1'（不耐涝朝天椒）、'ZHC2'（耐涝朝天椒）和'大方皱椒'（线椒）。'ZHC1'和'ZHC2'为遵义市农业科学院惠赠的纯系材料，'大方皱椒'为贵州当地种植的常规辣椒品种。

1.2 RNA 提取、cDNA 文库构建及基因功能注释

以耐涝'ZHC2'辣椒为试材，其培养及淹水处理参考郭豪等（2022）方法。待辣椒植株长至 5 片叶时，分别进行淹水 6 h（T1）、淹水 24 h（T2）和恢复 1 h（T3）3 个处理，并以正常培养的辣椒材料作为对照（CK）。试验包括 3 次生物学重复，每次生物学重复由 10 株长势一致的辣椒根系混合而成，取样后立即放入液氮中快速冷冻，然后放入-80℃超低温冰箱保存，使用 TRIzol®试剂盒（中国北京天根生物技术有限公司）提取总 RNA，用于转录组测序。测序文库的构建在华大基因技术服务有限公司进行，使用 Illumina HiSeq 2000 测序平台、Trinity 软件分别进行转录组的双末端测序、Clean reads 组装以及聚类去冗余，获得单基因（Unigene）。然后对 DEGs 进行 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）、GO（Gene Ontology）功能注释，对 Unigene 与 NT（NCBI non-redundant nucleotide sequence database）、NR（NCBI non-redundant protein sequences database）、SwissProt、Pfam（Protein family）和 KOG（euKaryotic Ortholog Groups）公共数据库中的序列进行同源性分析。

1.3 转录组 SSR 位点鉴别与引物设计

使用 MISA（v1.0）测定 Unigene 中的 SSR，限定一至六核苷酸序列 SSR 的重复次数至少为 12、6、5、5、4 和 4 个；并限定复合微卫星形成的标准为两个微卫星之间的距离小于 100 bp（Thiel et al., 2003）。使用 Primer 3 设计引物（Andreas et al., 2012），引物设计原则为：（1）引物长度为 18~24 bp；（2）产物大小为 80 ~300 bp；（3）退火温度（T_m）为 55~62 ℃，上下游引物退火温度（T_m 值）差值小于 5 ℃；（4）CG 含量为 40%~60%；避免引物二级结构的出现。从中任意挑选 30 对引物进行扩增。引物 由生工生物工程（上海）股份有限公司进行合成。

1.4 DNA 提取和 PCR 扩增

以'ZHC1'、'ZHC2'和'大方皱椒'为材料，待植株长至 5 叶 1 心时，采集顶部 2、3 片叶，液氮速冻后于-80 ℃保存。通过 CTAB 法进行 DNA 提取，用于引物的有效性筛选。PCR 反应体系与反应程序见表 1，PCR 反应在 T100^{TM}Thermal Cycler PCR 仪（BIORAD 公司）上进行。

表 1 PCR 反应体系和反应程序

Table 1 PCR reaction system and procedure

PCR 反应体系 PCR reaction system		PCR 反应程序 PCR reaction procedure	
10×PCR Buffer	2.0 μL	94 ℃预变性 94 ℃ initial denaturation	3 min
10 mmol·L^{-1}dNTP	1.0 μL	94 ℃变性 94 ℃ denaturation	1 min
10 μmol·L^{-1} R	1.0 μL	55 ℃退火 94 ℃ anneal	1 min
10 μmol·L^{-1} F	1.0 μL	72 ℃延伸 94 ℃ extention	30 s
Taq enzyme	1 U	循环次数 94 ℃ number of cycles	35
DNA	50 ng	72 ℃延伸 94 ℃ extention	5 min
ddH$_2$O	补至 20 μL Up to 20 μL	4 ℃保存 94 ℃ keeping	∞

1.5 EST-SSR 标记的多态性分析

用 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）电泳检测 PCR 扩增产物。于 120 V 电泳 2.0 h 后，进行银染显色和照相，分析 EST-SSR 标记的多态性效果。

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据的组装分析

从耐涝'ZHC2'辣椒不同淹水处理样品中分离 RNA，并对原始 Reads 进行过滤和组装，总共构建了 12 个 cDNA 文库。由表 2 可知，每个处理中 Q20 的比例均高于 Q20 规定的极限值（＞80%），GC 含量均低于 50%，表明测序质量良好。

表 2 辣椒转录组测序结果

Table 2 Summary of hot pepper transcriptome sequencing

样品 Sample	Unigene 数目 Unigene number	Q20 比例 Q20 ratio (%)	GC 比例 GC ratio (%)	总长度 Total length (bp)	平均长度 Mean length (bp)
CKr1	47 818	96.91	40.64	52 956 056	1 107
CKr2	45 912	97.06	40.80	50 958 549	1 109
CKr3	48 997	96.91	40.57	54 843 142	1 119
T1r1	48 454	97.06	40.51	54 038 837	1 115
T1r2	49 661	97.24	40.60	55 118 249	1 109
T1r3	51 447	96.98	40.39	58 720 692	1 141
T2r1	51 689	97.35	40.56	57 158 191	1 105
T2r2	53 299	97.09	40.65	49 788 703	934
T2r3	50 685	97.21	40.50	57 497 915	1 134
T3r1	49 580	97.12	40.81	53 356 736	1 076
T3r2	52 224	97.05	40.31	59 813 512	1 145
T3r3	50 496	97.00	40.51	56 742 113	1 123
均值 Average	50 022	97.08	40.57	55 082 725	1 101

注：r1、r2 和 r3 分别表示重复 1、重复 2 和重复 3。
Note: r1, r2 and r3 represent replication 1, replication 2, and replication 3, respectively.

对不同处理辣椒植物根系进行转录组测序，构建 12 个 cDNA 文库，获得 Clean reads 共 153.99 Gb，对其组装去冗余后，得到 Unigene 128 939 个（图 1）。总长度、平均长度、GC 含量依次为 55 082 725 bp、1 101 bp 和 40.57%。在所有 Unigene 中，57 243 个基因长度介于 200~1 000 bp 之间，所占比例为 44.40%，35 213 个长度介于 1 000~2 000 bp 之间，所占比例为 27.31%，19 321 个长度介于 2 000~3 000 bp 之间，所占比例为 14.98 %，17 162 个长度大于 3 000 bp，所占比例为 13.31%。

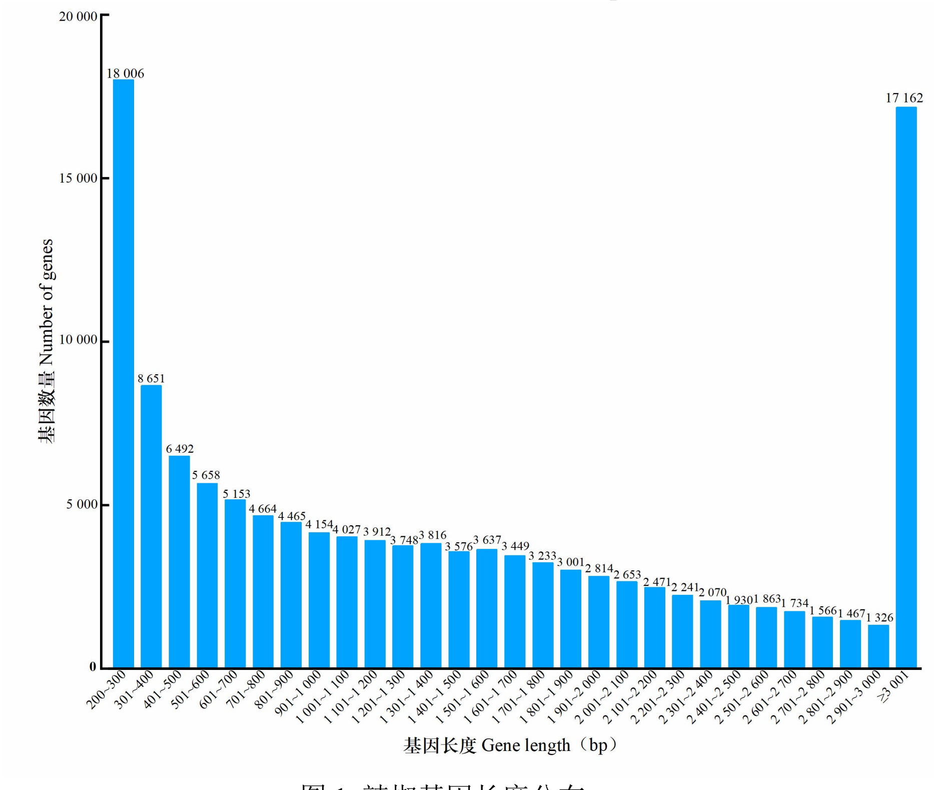


图 1 辣椒基因长度分布
Fig.1 Distribution of Unigene length in hot pepper

2.2 基因的功能注释

将 Unigene 比对到 NR、NT、SwissProt、KOG、KEGG、GO 和 Pfam 数据库（表 3），分别有

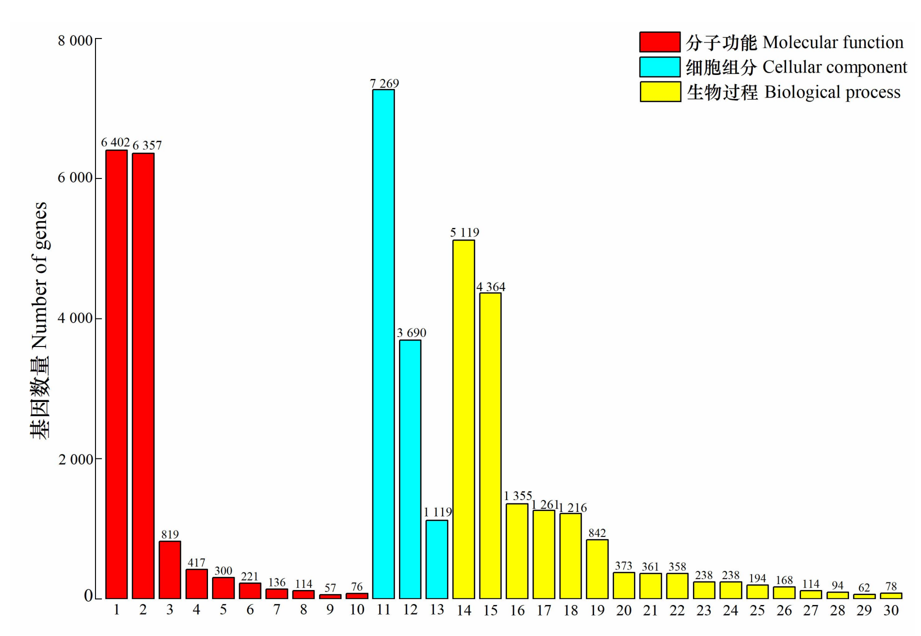
102 123（79.20%）、110 157（85.43%）、70 203（54.45%）、73 539（57.03%）、77 646（60.22%）、77 442（60.06%）以及 68 216（52.91%）个 Unigene 获得功能注释，被任意一个数据库注释的 Unigene 有 116 057 个，占 Unigene 总数的 90.01%。

表 3 单基因功能注释

Table 3 Function annotation of Unigene

数据库 Database	基因数量 Number of genes	比例 Ratio（%）
NR	102 123	79.20
NT	110 157	85.43
SwissProt	70 203	54.45
KOG	73 539	57.03
KEGG	77 646	60.22
GO	77 442	60.06
Pfam	68 216	52.91

将水涝胁迫与对照相比的 DEGs 进行 GO 功能注释。共有 43 446 个 DEGs 被注释在 GO 数据库中（图 2），可分成分子功能、细胞组分以及生物过程三大类。分子功能中主要方面是结合（binding）、催化活性（catalytic activity）及转运活性（transporter activity）。细胞组分中主要方面是细胞解剖实体（cellular anatomical entity）、胞内（intracellular）以及含蛋白复合物（protein-containing complex）。在生物过程中细胞过程（cellular process）占据主导地位，其次是代谢过程（metabolic process）和生物调节（biological regulation）。13 702 个 DEGs 被注释到 KEGG 通路中（图 3）。其中碳水化合物代谢（carbohydrate metabolism）、脂质代谢（lipid metabolism）与氨基酸代谢（amino acid metabolism）是主要的代谢途径。与代谢相关的 DEGs 有 8 404 个，包含碳水化合物（16.52%）、氨基酸（9.22%）、脂质（7.03%）、其他次级代谢物的生物合成（6.08%）以及能量代谢（4.99%）等。在遗传信息处理（genetic information processing）中，主要为翻译（translation）和折叠、分类和降解（folding，sorting and degradation）以及转录（transcription）3 个过程。在环境信息处理（environment information processing）途径中主要是信号转导（signal transduction）与跨膜运输（membrane transport）。运输和分解代谢（transport and catabolism）及环境适应（environmental adaptation）是细胞过程和有机系统中主要途径。这说明在淹水过程中辣椒受到碳水化合物代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、信号传导等途径的协同作用，这些通路可能在辣椒水涝胁迫应答中起到重要作用。



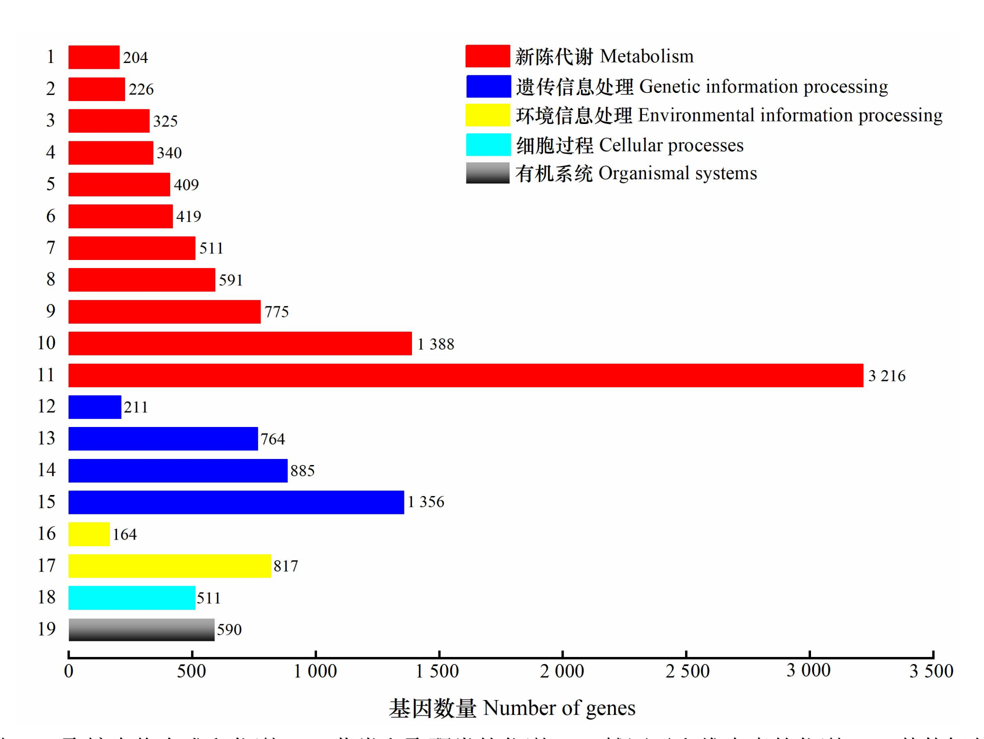
1. 结合；**2**. 催化活性；**3**. 转运蛋白活性；**4**. 结构分子活性；**5**. 转录调节活性；**6**. 分子功能调节活性；**7**. 抗氧化活性；**8**. 翻译调节活性；**9**. 分子换能器活性；**10**. 其他；**11**. 细胞解剖实体；**12**. 细胞内；**13**. 蛋白质复合物；**14**. 细胞过程；**15**. 代谢过程；**16**. 生物调节；**17**. 对刺激的反应；**18**. 生物过程的调节；**19**. 定位；**20**. 发育过程；**21**. 信号传导；**22**. 多细胞生物过程；**23**. 繁殖；**24**. 繁殖过程；**25**. 生物过程负调节；**26**. 生物过程正调节；**27**. 多生物过程；**28**. 生物间的相互作用；**29**. 增长；**30**. 其他。

1. Binding; **2**. Catalytic activity; **3**. Transporter activity; **4**. Structural molecule activity; **5**. Transcription regulator activity; **6**.

Molecular function regulator; **7**. Antioxidant activity; **8**. Translation regulator activity; **9**. Molecular transducer activity; **10**. Other; **11**. Cellular anatomical entity; **12**. Intracellular; **13**. Protein-containing complex; **14**. Cellular process; **15**. Metabolic process; **16**. Biological regulation; **17**. Response to stimulus; **18**. Regulation of biological process; **19**. Localization; **20**. Developmental process; **21**. Signaling; **22**. Multicellular organismal process; **23**. Reproduction; **24**. Reproductive process; **25**. Negative regulation of biological process; **26**. Positive regulation of biological process; **27**. Multi-organism process; **28**. Interspecies interaction between organisms; **29**. Growth; **30**. Other.

图 2 辣椒 DEGs 的 GO 注释

Fig.2 GO annotation of hot pepper DEGs



1. 核苷酸代谢；**2**. 聚糖生物合成和代谢；**3**. 萜类和聚酮类的代谢；**4**. 辅因子和维生素的代谢；**5**. 其他氨基酸的代谢；**6**. 能量代谢；**7**. 其他次级代谢产物的生物合成；**8**. 脂质代谢；**9**. 氨基酸代谢；**10**. 碳水化合物代谢；**11**. 全局和概览图；**12**. 复制和修复；**13**. 转录；**14**. 折叠、分类和降解；**15**. 翻译；**16**. 膜运输；**17**. 信号转导；**18**. 运输和分解代谢；**19**. 环境适应。

1. Nucleotide;metabolism; **2**. Glycan biosynthesis and metabolism; **3**. Metabolism of terpenoids and polyketides; **4**. Metabolism of cofactors and vitamins; **5**. Metabolism of other amino acids; **6**. Energy metabolism; **7**. Biosynthesis of other secondary metabolites; **8**. Lipid metabolism; **9**. Amino acid metabolism; **10**. Carbohydrate metabolism; **11**. Global and overview maps; **12**. Replication and repair; **13**. Transcription; **14**. Folding, sorting and degradation; **15**. Translation; **16**. Membrane transport; **17**. Signal transduction; **18**. Transport and catabolism; **19**. Environmental adaptation.

图 3 辣椒 DEGs 的 KEGG 注释

Fig.3 KEGG annotation of hot pepper DEGs

2.3 EST-SSR 的频率和分布特点

使用 MISA 对所有的 Unigene 进行 SSR 位点检测，共发现 26 574 个 SSR 位点分布在 24 889 个 Unigene 当中，其中 23 451 个 Unigene 含有单一 SSR，1 438 个 Unigene 包含 3 123 个 SSR 位点，SSR 位点出现频次（SSR 数目占 Unigene 总数百分比）为 20.61%，SSR 发生频次（含 SSR 的 Unigene 数占总 Unigene 数百分比）为 19.30%。从表 4 可以看出，辣椒 EST-SSR 序列主要以 4~10 次重复为主，共 15 411 个，占总 EST-SSR 的 58.00%；其次是 11~20 次重复，共 10 125 个，占总 EST-SSR 的 38.10%；20 次以上的重复较少，共 1 038 个，占 3.91%。在已鉴定的 SSR 中，单核苷酸基序 SSR 最丰富（9 902，37.26%），其次是三核苷酸（8 238，31.00%）、二核苷酸（6 760，25.44%）、六核苷酸（838，3.15%）、五核苷酸（466，1.75%）和四核苷酸（370，1.39%）基序 SSR。

表 4 辣椒 EST-SSR 的类型、数量及分布频率

Table 4 Type, number and distribution frequency of EST-SSR in hot pepper

SSR 重复类型 SSR repeat type	重复次数 Repeat number 4	5	6	7	8	9	10	11~20	>20	总计 Total	比例 Ratio（%）
单核苷酸 Mono-nucleotide	0	0	0	0	0	0	0	8 991	911	9 902	37.26
二核苷酸 Di-nucleotide	0	0	2 422	1 572	806	486	416	943	115	6 760	25.44
三核苷酸 Tri-nucleotide	0	4 510	1 945	969	456	100	101	148	9	8 238	31.00
四核苷酸 Tetra-nucleotide	0	235	85	18	6	2	5	18	1	370	1.39
五核苷酸 Penta-nucleotide	340	76	24	5	11	2	2	4	2	466	1.75
六核苷酸 Hexa-nucleotide	568	113	59	49	12	10	6	21	0	838	3.15
总计 Total	908	4 934	4 535	2 613	1 291	600	530	10 125	1 038	26 574	
比例 Ratio (%)	3.42	18.57	17.07	9.83	4.86	2.26	1.99	38.10	3.91		

2.4 EST-SSR 基序重复类型和频率特征

从辣椒 EST-SSR 核苷酸的基序类型来看，EST-SSR 以单核苷酸为主要类型，约 9 902 个，占总 SSR 的 37.26%，其次是三核苷酸 8 238 个（31.00%）和二核苷酸 6 760 个（25.44%），三者共占检测出 SSR 总数的 93.70%。在单核苷酸中，A/T 是主要类型，占全部单核苷酸的 95.58%，其次为三核苷酸，以 TTG/CAA、ACA/TGT 为主要类型，分别占三核苷酸 SSR 的 18.10%、12.71%。在二核苷酸中，以 AG/CT、GA/TC、AT 和 TA 的比例最高，占所有二核苷酸 SSR 总量的 23.30%、21.02%、20.58%和 17.25%。而四、五、六 3 种核苷酸基序出现频次均较低，三者一起共占 SSR 总数的 6.30%；四核苷酸中，以 TTTA/TAAA、AATA/TATT 和 AAAT/ATTT 的比例最高，分别占四核苷酸 SSR 的 13.78%、10.27%和 9.73%；在五核苷酸中，以 ATGGT、ACTCA 所占比例最高，各占五核苷酸 SSR 的 6.01%和 4.08%；在六核苷酸中，以 GAAGAG、GAGCTG 的数量最多，各占六核苷酸 SSR 的 3.82%和 3.10%（表 5）。

表 5 辣椒 EST-SSR 基序的分布

Table 5 Distribution of EST-SSR motif in hot pepper

重复类型 Repeat type	SSR 基序 SSR motif	重复次数 Repeat number	重复类型 Repeat type	SSR 基序 SSR motif	重复次数 Repeat number
单核苷酸 Mono-nucleotide		9 902		AGC/GCT	192
	A/T	9 464		ACC/GGT	189
	C/G	438		ATG/CAT	184
二核苷酸 Di-nucleotide		6 760		TCC/GGA	183
	AG/CT	1 575		AGG/CCT	169
	TC/GA	1 421		TGC/GCA	144
	CA/TG	622		TAC/GTA	79
	AC/GT	529		GCC/GGC	73
	AT	1 391		TAG/CTA	65
	TA	1 166		TCG/CGA	60
	GC	44		CCG/CGG	58
	CG	12		ACT/AGT	47
三核苷酸 Tri-nucleotide		8 238		CGC/GCG	38
	TTG/CAA	1 491		GAC/GTC	27
	ACA/TGT	1 047		ACG/CGT	6
	TTC/GAA	739	四核苷酸 Tetra-nucleotide		370
	AAG/CTT	488		TTTA/TAAA	51
	AAC/GTT	384		AATA/TATT	38
	AGA/TCT	333		AAAT/ATTT	36
	TGG/CCA	309		其他 Others	245
	AAT/ATT	305	五核苷酸 Petra-nucleotide		466
	TCA/TGA	286		ATGGT	28
	ATA/TAT	240		ACTCA	19
	CAC/GTG	239		其他 Others	419
	CAG/CTG	233	六核苷酸		838

		Hexa-nucleotide	
ATC/GAT	217	GAAGAG	32
TAA/TTA	210	GAGCTG	26
CTC/GAG	203	其他 Others	780

2.5 EST-SSR 的长度统计

EST-SSR 的长度范围为 12~110 bp，其中 12 bp 和 15 bp 分布最多，分别有 5 331（20.06%）和 5 523（20.78%）个 SSR 位点（图 4）。在单核苷酸和二核苷酸中，最常见的片段长度为 12 bp，在单核苷酸中有 2 909（10.95%）个位点，二核苷酸中有 2 422（9.11%）个位点。单核苷酸和二核苷酸最长的片段分别是 102 bp 和 96 bp。在三核苷酸中，主要长度类型是 15 bp 和 18 bp，二者分别有 4 510（16.97%）和 1 945（7.32%）个位点，二者占三核苷酸位点总数的 78.36%。四核苷酸及五核苷酸均以 20 bp 为主，分别有 235（0.88%）和 340（1.28%）个位点。六核苷酸中最长的为 90 bp，检测到 4 个位点，24 bp 占绝大多数（568，2.14%）。在本研究中，SSR 有 6 018 条 SSR 的长度大于 20 bp，占 SSR 总数的 22.65 %；20 556 条 SSR 分布于 12~19 bp 之间，占 SSR 总数的 77.35%。

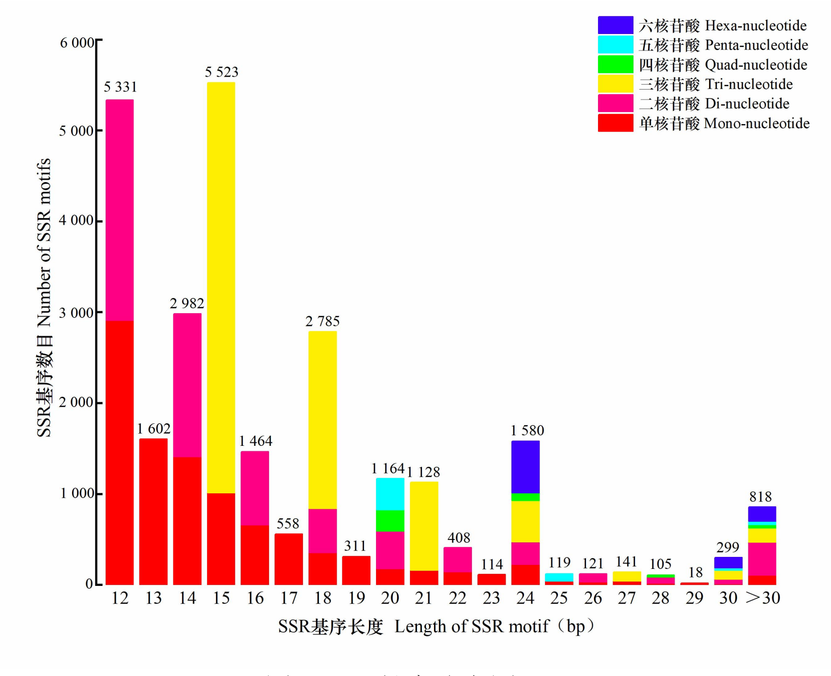


图 4 SSR 长度分布图

Fig. 4 Distribution of SSR length

2.6 辣椒 EST-SSR 引物筛选与验证

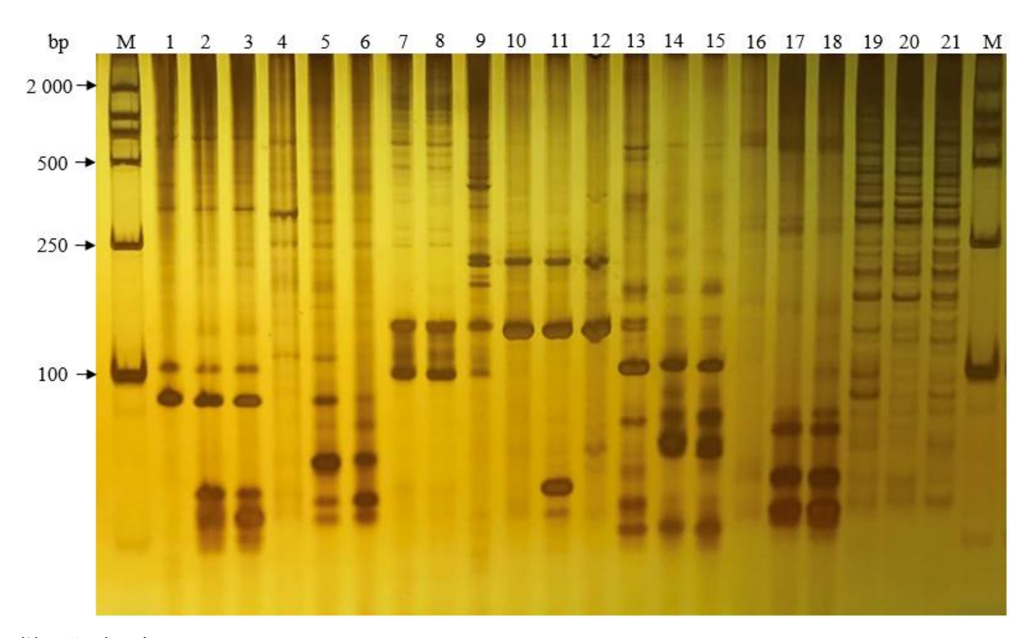
使用 Primer 3 对含有 SSR 的 21 008 条 EST 序列设计了 10 002 对 SSR 引物。为验证其有效性，随机选择 30 对引物进行合成，引物信息见表 6，以'大方皱椒'、'ZHC1' 和'ZHC2' 3 个辣椒材料的 DNA 进行 PCR 扩增与引物筛选，由图 5 可知，所挑选的全部引物均可扩增，而其中 7 对引物在 3 个辣椒材料中可以扩增出目的条带，占挑选引物总数的 23.33%，推测可用的 EST-SSR 数量有 2 333 对，可作为后续参考使用。引物分别为 *Unigene*12971_*All*_10480、*CL*10067.*Contig1*_*All*_6591、*CL*10579.*Contig*2_*All*_6940、*CL*10070.*Contig*1_*All*_6593、*CL*10751.*Contig*1_*All*_7072、*CL*10564.*Contig*1_*All*_6936、*CL*10056.*Contig*8_*All*_6589。

表 6 30 对 SSR 引物信息

Table 6 30 pairs of SSR primer information

SSR ID	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	重复基序 Repeat motif	预期产物大小 Expected product size（bp）
*CL*10034.*Contig*3_*All*_6578	GCAAATCCAGTACTAACCACGAC TTCCTCCTCTTCCGTTTCTACTT	GAAGAG (6×7)	132
*CL*10053.*Contig*3_*All*_6584	CGATCCTCATCGATCTAACTTTG ACCGCTTAATCATCTCAAAAACA	AT (2×6)	114
*CL*10056.*Contig*7_*All*_6586	AATTTACTCTTTCCCACATCACG TCCATATACATGATCAGCACTCG	C (1×13)	152

*CL*10056.*Contig*8_*All*_6589	CACTTCCACAGACCACAAAAATA ACTTCTACCGTCAATCACCTGAC	CT (2×9)	150
*CL*10067.*Contig*1_*All*_6591	TCAAGAGATCAAAATCAATGCCT GACGATGATGATGAAGATGATGA	ATA (3×6)	150
*CL*10070.*Contig*1_*All*_6593	TTGGTTGGTCAAAAGAACAGATT TCACAATTTCAATCCCCATAAAC	GCT (3×5)	124
*CL*1018.*Contig*2_*All*_1327	GCTGTCGTAATTGCGTAGCTAGT AAGGCGGCTATAGATGGGTATAA	TATG (4×5)	134
*CL*1047.*Contig*27_*All*_1360	AAAAACTTCCTTATACTGCCTCCC ACATTATATGACAAGGGAGCGTG	AC (2×21)	150
*CL*10499.*Contig*3_*All*_6884	ATCTTACCCTTCAGACCCCACTA TTCTAAATGTGCAGCAAAGTGAA	TTG (3×6)	149
*CL*10534.*Contig*4_*All*_6919	CATTTCTCCATTTTACTAAGCTCCA CATTGAAGCATACAAGCCTTTTC	TCT (3×5)	100
*CL*10564.*Contig*1_*All*_6936	CAGCTGCTTAAAGTATAAGGCGA ATAACATGTAAGCTCCAACCCCT	ACT (3×6)	125
*CL*10579.*Contig*2_*All*_6940	CAACGGACAATAGTGGGATTACA CACCTTATTTGTGACCGAGACAT	TGT (3×5)	157
*CL*10604.*Contig*2_*All*_6943	TTTGGTTGTAATTTTGGTGTTATGA TAATCATCGAACTTCCGTTTGTT	TTC (3×7)	145
*CL*10668.*Contig*1_*All*_6994	GAGACACACGTTCCATCATCTTC GAACGTATCTTGCTCCTTGATGA	GCA (3×6)	107
*CL*10751.*Contig*1_*All*_7072	TAATTTCTTTTGCGGCAGTTCTA TCCAGTTGCAAAATTAGGAAAGA	TG (2×13)	94
*CL*10810.*Contig*3_*All*_7117	TTTATAACTCCCTGAATCCACCA TTGTTAAGCTCAAATCGGAAAAT	TA (2×10)	115
*CL*11228.*Contig*13_*All*_7734	AGGTAGCGGTATTGGTATGGACT CCACTGCATGAGGACACTAAAAT	TTG (3×7)	128
*Unigene*11434_*All*_10207	ACTAGGTGGGAATACACTGGGTT AAGATCATGAAAGCAGCAAACAT	TTG (3×6)	160
*Unigene*1155_*All*_8659	CCCATACCCGGATTATTACTCTT TTTGTGCCAGACAGCAATATTTA	TTA (3×6)	102
*Unigene*1203_*All*_8666	CAGCCACACTTAGCAACTTCTTT CCTGTACCACGCTTGTAGGATTA	ACA (3×5)	160
*Unigene*12494_*All*_10392	GATGTTATGGGTGTGGAAAAGAA CTATTGCTTGACTCTCAGGTGCT	AAG (3×5)	140
*Unigene*1264_*All*_8674	ATCTCCACTTTGTGAGACTGGAA TTTGTGTTCGGCAAGAAAAATA	TAT (3×6)	99
*Unigene*12971_*All*_10480	GGACTGCGTACATTCTACCCTC GAATCATCAAATGGGATACAGGA	TTG (3×6)	152
*Unigene*13561_*All*_10584	TATTGGAAGGTTGTTGTCTCTGC GAGCAAAACGAAGGAAGAAAAAT	TA (2×11)	156
*Unigene*1375_*All*_8685	AATAATGCCTCGTTGTTTCAAGA CTATCGCGTACGAAGATGTCTGT	CAA (3×6)	112
*Unigene*14198_*All*_10688	GCAGCTTCCTTCATTTTGTGTAG ACTAGGTGGGAATACACTGGGTT	AAC (3×6)	84
*Unigene*14412_*All*_10734	TTCGGGTTGTAATAATTGGACTG CCACGGTCTCTTGGTAAAGTGTA	TTTGT (5×4)	143
*Unigene*14997_*All*_10836	GAAAATGTTTTCCTCCACACTGA GTGGTACGGTATGCGTACACTTT	ACA (3×6)	147
*Unigene*15303_*All*_10895	CTCACCAAAACAATGGAACATTT TGAGGTAGTGCCTAGTGGTATGG	ACA (3×6)	142
*Unigene*1722_*All*_8697	TCCCTGAGGAGTATAATTTGCCT AATTCAAGAACTTGCCTTGATGA	CTT (3×5)	112



1~21. 点样顺序为 *Unigene*12971_*All*_10480、*CL*10067.*Contig*1_*All*_6591、*CL*10579.*Contig*2_*All*_6940、*CL*10070.*Contig*1_*All*_6593、*CL*10751.*Contig*1_*All*_7072、*CL*10564.*Contig*1_*All*_6936、*CL*10056.*Contig*8_*All*_6589 引物的扩增结果，每对引物中以‘ZHC1’、‘ZHC2’、‘大方皱椒’的顺序点样。**M**. DL2000 Marker。

1~21. The orders of sampling are the amplification results of *Unigene*12971_*All*_10480, *CL*10067.*Contig*1_*All*_6591, *CL*10579.*Contig*2_*All*_6940, *CL*10070.*Contig*1_*All*_6593, *CL*10751.*Contig*1_*All*_7072, *CL*10564.*Contig*1_*All*_6936, *CL*10056.*Contig*8_*All*_6589 primers, respectively. Among each pair of primers, the samples are ‘ZHC1’, ‘ZHC2’ and ‘Dafangzhoujiao’, respectively. **M**. DL2000 Marker.

图 5 7 对 EST-SSR 引物的扩增结果

Fig. 5 Amplification results of seven pairs of EST-SSR primers

3 讨论与结论

3.1 辣椒转录组数据组装与功能注释

通过植物转录组检测技术可以获取大量的转录本信息，这为植物基因表达的综合分析提供了合理而可信的数据资源（贾新平等，2014）。因此，在淹水胁迫下辣椒转录组信息的系统分析为全面了解辣椒耐涝分子机制和挖掘新的耐涝基因奠定基础。本研究对不同淹水时间的辣椒根系进行转录组测序，对数据组装共获得 128 939 个 Unigene。把这些 Unigene 在 NR、NT、Swissprot、KEGG、KOG、Pfam 和 GO 数据库中加以注释，得到注释 Unigene 共有 116 057 个，占总 Unigene 的 90.01%，有 12 882 个 Unigene 没有得到注释。与其他植物相比（张小红等，2022；夏铭泽，2022），在水涝胁迫下辣椒转录组测序获得的基因数量及注释效率均较高。组装得到的 Unigene 不能在已知相关基因数据库得到注释，这种现象是普遍存在的，这与所得部分 Unigene 片段太短、相关数据库基因注释信息缺乏、辣椒中存在新基因等因素都有关联（张少平等，2016）。可以对未被注释的基因进一步研究，确定这些基因在植物生长发育过程中的作用，从而丰富基因数据库（马彦军等，2020）。本研究对 DEGs 进行 KEGG 注释时，发现碳水化合物、氨基酸、脂质等代谢注释最多，其次为翻译、折叠、遗传信息分类和降解以及信号转导。植物在受到水涝胁迫的时候，植物根系缺氧导致线粒体有氧呼吸受到极大抑制。碳水化合物代谢对植物存活至关重要，在此过程中，植物通过积累易利用糖类和额外丙酮酸等物质以保持其能量供应。氨基酸代谢在植物应对非生物胁迫中发挥着重要作用（Hildebrandt et al., 2018）。其中，对脯氨酸的研究最为广泛，但其他氨基酸，如支链氨基酸（亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸）也同样重要（Huang et al., 2017），其氧化会产生大量的三磷酸腺苷（Hildebrandt et al., 2015）；而丙氨酸和天冬氨酸在其相应氨基转移酶作用下通过影响草酰乙酸的量而参与丙酮酸的再生，可以为植物逆境生存提供物质与能量，这可能是 ZHC2 辣椒耐涝性强的原因之一。在脂质代谢过程中，耐缺氧型个体脂质分解加强，其分解为甘油和游离脂肪酸，甘油可用于碳和能量供应以及不定根发育，而游离脂肪酸可为新生成的细胞提供成分。当辣椒受到水涝胁迫时，碳水化合物代谢可以产生足够能量使植物维持多种生理生化反应，同时植物需要合成大量的酶来催化体内的多种生理生化反应；将受到的刺激信号进行传导，以便植物能产生应激反应来应对不良环境造成的影

响。试验将进一步对重要差异基因进行分析，筛选出与辣椒耐涝紧密相关的基因，解释辣椒耐涝的分子机制。

3.2 辣椒转录组 EST-SSR 的重复类型与频率特征

本研究发现 26 574 个 SSR 位点分布于 128 939 条辣椒无冗余 Unigene 中，EST-SSR 出现频率为 20.61%，高于 Yi 等（2006）、刘峰等（2012）、魏兵强等（2013）的辣椒 EST-SSR 结果，低于蓖麻（Qiu et al., 2010）、木薯（Kunkeaw et al., 2011）、灰毡毛忍冬（刘思思等，2021）的 EST-SSR 结果，这可能是由于物种间 SSR 信息的差异造成的，也可能因为用于分析 EST 数量在不同物种间各不相同，或者用于搜索 SSR 所使用的软件算法及所设定的参数不同（吴智明等，2012）。辣椒 EST-SSR 单核苷酸频率最高（37.26%），其次是三核苷酸（31.00%）和二核苷酸（25.44%）。在辣椒单核苷酸 EST-SSR 中，绝大部分基元为 A/T，这与魏兵强等（2013）、刘峰等（2012）的结果一致。在二核苷酸重复类型中，出现频率最高的是 AG/CT 和 TC/GA，其次是 AT 和 TA，而 GC/CG 出现频率低，这与 Yi 等（2006）、Kantety 等（2002）、张宇等（2010）在辣椒上的研究结果基本一致，而且与珍珠粟（Selthilvel et al., 2008）、石蒜（李青竹等，2021）、蝴蝶兰（张水明等，2012）和毛竹（张智俊等，2011）的结果相似，说明 EST-SSR 在其发生和进化过程中具有高度保守性。GA/TC 在 mRNA 水平上可以代表遗传密码子 GAG、AGA、UCU 和 CUC，并分别可以翻译成精氨酸、谷氨酸、丙氨酸和亮氨酸，而丙氨酸和亮氨酸分别以 8%和 10%的高频率存在于蛋白质中，这可能是 GA/TC 在 EST 中高频出现的原因（Kantety et al., 2002）。在三核苷酸中，出现频率高的是 TTG/CAA、ACA/TGT，这与 Kumpatla 等（2005）和 Yi 等（2006）对辣椒 EST-SSR 的研究结果相符合。但刘峰等（2012）研究认为，辣椒 EST-SSR 除单核苷酸 A/T 重复序列外，最多的是三核苷酸重复序列 AAC/GTT 和 AAG/CTT，其次是二核苷酸重复序列。这可能是 SSR 搜索标准（基序长度、重复次数等）、分析软件及数据库大小不同造成的。

3.3 辣椒转录组 EST-SSR 的多态性

本研究中共有 6 018 条 SSR 长度大于 20 bp，占全部 SSR 总数的 22.65%；20 556 条 SSR 长度介于 12~19 bp 之间，占所有 SSR 总数的 77.35%，说明辣椒 EST-SSR 具有较好的多态性（Temnykh et al., 2001），这与盛文涛等（2019）的研究结果基本一致，可用于辣椒分子标记研究。根据 26 574 条 EST 序列设计了 10 002 对 SSR 位点特异性引物，从中随机挑选了 30 对引物进行 PCR 验证，都可以实现有效扩增，EST 数据量大和较高的拼接质量应是扩增效率高的原因。30 对扩增引物中，有 7 对（23.3%）引物在 3 份辣椒中表现出多态性，低于李永平等（2016）的结果（35.5%），其原因可能与本研究所选用的 3 份辣椒材料均为贵州地方品种，且‘ZHC1’、‘ZHC2’为朝天椒，材料间的遗传背景差异小有关。EST-SSR 来自于基因组转录区，而转录区的序列通常比较保守。因此，一般来讲 EST-SSR 所检测到的多态性要低于基因组 SSR。但多态性检测能力的评价也与所测试的植物材料有关；如果所用的植物材料遗传背景差异较大，则标记检测的多态性就高，反之，则标记的多态性就会大大降低。应用 EST-Genome、Phrap、Clustalw、BLAST 等软件对 EST 序列进行精确分析增加供试材料基因型与数量是提高 EST-SSR 标记多态性和价值性的有效途径（张宇等，2010）。因为 EST-SSR 是对基因内部变异的一种直接评价，所以它将可能与某些表型、生理生化特征或某个特定的环境适应型相联系，反应植物基因表达的转录部分（姚利华等，2008）。挑选的 EST-SSR 标记可用于遗传多样性分析与分子标记辅助育种。由于其丰富的多态性信息含量，EST-SSR 也可为遗传连锁图谱构建等奠定基础。下一步可寻找与辣椒耐涝基因连锁的 EST-SSR 标记，以应用于辣椒耐涝育种研究。

参考文献：

AN Q, FENG YH, YANG ZQ, et al., 2022. EST-SSR marker development and interspecific generality of *Albizzia odoratissima*[J]. Guihaia, 42(8): 1374-1382. [安琪，冯源恒，杨章旗，等，2022. 香合欢 EST-SSR 标记开发及种间通用性研究[J]. 广西植物，42(8): 1374-1382]

ANDREAS U, IOANA C, TRIINU K, et al., 2012. Primer 3-new capabilities and interfaces[J]. Nucl Acid Res, 40 (15): e115.

CHEN YW, LIAO RJ, YE BH, et al., 2020. Analysis on SSR loci in transcriptome and development of molecular markers in *Polygonatum cyrtonema*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 51(1): 182-189. [陈友吾，

廖荣俊，叶碧欢，等，2020. 多花黄精转录组 SSR 位点分析及分子标记开发[J]. 中草药，51(1): 182-189.]
FU HF, LÜ XH, CHEN JY, et al., 2018. Genetic diversity analysis of capsicum germplasm based on phenotypic traits with SSR markers[J]. J Nucl Agric Sci, 32(7): 1309-1319. [傅鸿妃，吕晓菡，陈建瑛，等，2018. 辣椒种质表型性状与 SSR 分子标记的遗传多样性分析[J]. 核农学报，32(7): 1309-1319.]
GUAN JJ, YU ZH, YANG XH, et al., 2019. Study on the application of SSR markers in pepper (*Capsicum annuum* L.) DUS Testing[J]. J Plant Genet Resour, 20(2): 396-405. [管俊娇，余志慧，杨晓洪，等，2019. SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用研究[J]. 植物遗传资源学报，20(2): 396-405.]
GUO H, TIAN H, ZHANG SQ, et al., 2022. Growth and physiological responses of *Capsicum frutescens* seedlings to waterlogging stress[J]. N Hortic, (2): 1-8. [郭豪，田浩，张素勤，等，2022. 朝天椒苗期对水涝胁迫的生长及生理响应[J]. 北方园艺，(2): 1-8.]
HUANG SW, ZHANG BX, MILBOURNE D, et al., 2000. Development of pepper SSR markers from sequence databases[J]. Euphytica, 117: 163-167.
HILDEBRANDT TM, 2018. Synthesis versus degradation: Directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response[J]. Plant Mol Biol, 98: 121-135.
HILDEBRANDT TM, NESI AN, ARAUJO WL, et al., 2015. Amino acid catabolism in plants[J]. Mol Plant, 8(11): 1563-1579.
HUANG TF, JANDER G., 2017. Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*[J]. Planta, 246: 737-747.
HU WS, CHEN XP, ZHENG SQ, 2019. EST-SSR markers developed from *Dimocarpus longan* and their application in genetic diversity analysis of five genera of Sapindaceae[J]. Acta Hortic Sin, 46 (7): 1359-1372. [胡文舜，陈秀萍，郑少泉，2019. 龙眼 EST-SSR 标记开发及无患子科 5 个属种质遗传多样性分析[J]. 园艺学报，46 (7): 1359-1372.]
JAIN M, SRIVASTAVA PL, VERMA M, et al., 2016. Denovo transcriptome assembly and comprehensive expression profiling in *Crocus sativus* to gain insights into apocarotenoid biosynthesis[J]. Sci Rep, 6: 22456.
JIANG CY, LIAO J, XU XB, et al., 2009. Plant EST-SSR technology and its application[J]. Mol Plant Breed, 7(1): 125-129. [姜春芽，廖娇，徐小彪，等，2009. 植物 EST-SSR 技术及其应用[J]. 分子植物育种，7(1): 125-129.]
JIA XP， SUN XB， DENG YM, et al., 2014. Sequencing and analysis of the transcriptome of *Asplenium nidus*[J]. Acta Hort Sin, 41(11): 2329-2341. [贾新平，孙晓波，邓衍明，等，2014. 鸟巢蕨转录组高通量测序及分析[J]. 园艺学报，41(11): 2329-2341.]
KANTETY RV, ROTAL ML, MATTHEWS DE, et al., 2002. Data mining for simple sequence repeat in expressed sequence tags from barly, maize, rice, sorghum and wheat[J]. Plant Mol Biol, 48: 501-510.
KINGA K, MICHAL WS, IZABELA M et al., 2021. Long-term waterlogging as factor contributing to hypoxia stress tolerance enhancement in cucumber: Comparative transcriptome analysis of waterlogging sensitive and tolerant accessions[J]. Genes, 12(2): 189-216.
KUNKEAW S, YOOCHA T, SRAPHET S, et a1., 2011. Construction of a genetic linkage map using simple sequence repeat markers from expressed sequence tags for cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Mol Breed, 27: 67-75.
KUMPATLA SP, MUKHOPADHYAY S, 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species[J]. Genome, 48(6): 985-998.
LIU F, WANG YS, TIAN XL, et al., 2012. SSR mining in pepper (*Capsicum annuum* L.) transcriptome and the polymorphism analysis[J]. Acta Hortic Sin, 39(1): 168-174. [刘峰，王运生，田雪亮，等，2012. 辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析[J]. 园艺学报，39(1): 168-174.]
LIU SS, QIAO ZQ, ZENG HJ, et al., 2021. Analysis on SSR loci in transcriptome and development of EST-SSR molecular markers in *Lonicera macranthoides*[J]. Mol Plant Breed, 19(9): 3015-3021. [刘思思，乔中全，曾慧杰，等，2021. 灰毡毛忍冬转录组 SSR 位点分析及 EST-SSR 标记开发[J]. 分子植物育种，19(9): 3015-3021.]
LIU ZB, YANG BZ, OU LJ, et al., 2015. The impact of different Ca^{2+} spraying period on alleviating pepper injury under the waterlogging stress[J]. Acta Hortic Sin, 42(8): 1487-1494. [刘周斌，杨博智，欧立军，等，2015. 不同时期外施 Ca^{2+}缓解辣椒淹水胁迫伤害的研究[J]. 园艺学报，42(8): 1487-1494.]

LI H, FENG YH, TANG SS, et al., 2022. Development and validity evaluation of *Liquidambar formosana* EST-SSR primers based on transcriptome sequencing[J]. Guihaia. https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20220629.1325.006.html. [李辉，冯源恒，唐生森，等，2022. 基于转录组测序的枫香 EST-SSR 引物开发及有效性评价[J]. 广西植物. https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20220629.1325.006.html.]

LI QZ, CAI YM, ZHANG YC, et al., 2021. Development and application of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Lycoris* spp.[J]. J Nucl Agric Sci, 35(9): 2002-2015. [李青竹，蔡友铭，张永春，等，2021. 基于石蒜属转录组序列的 SSR 分子标记开发应用[J]. 核农学报，35(9): 2002-2015.]

LI YP, LING H, KANG JB, et al., 2016. Development and utility of EST-SSR marker in *Capsicum annuum* L.[J]. Fujian J Agric Sci, 31(11): 1187-1192. [李永平，林珲，康建坂，等，2016. 辣椒 EST-SSR 标记的开发与验证[J]. 福建农业学报，31(11): 1187-1192.]

LI Z, BAI DF, ZHONG YP, et al., 2022. Full-length transcriptome and RNA-seq analyses reveal the mechanisms underlying waterlogging tolerance in kiwifruit (*Actinidia valvata*)[J]. Int J Mol Sci, 23: 3237-3250.

LUO R, WU WL, ZHANG Y, et al., 2010. SSR marker and its application to crop genetics and breeding[J]. Genom Appl Biol, 29 (1): 137-143. [罗冉，吴委林，张旸，等，2010. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学，29 (1): 137-143.]

MA YJ, DUAN HR, WEI J, et al., 2020. Transcriptome sequencing analysis of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress[J]. Biotechnol Bull, 36(2): 100-109. [马彦军，段慧荣，魏佳，等，2020. NaCl 胁迫下黑果枸杞转录组测序分析[J]. 生物技术通报，36(2): 100-109.]

NARSAI R, ROCHA M, GEIGENBERGER P, et al., 2011. Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia[J]. New Phytol, 190(2): 472-487.

PIMPRAPAI B, PIYADA J, ORNUSA K et al., 2019. Comparative transcriptome analysis of waterlogging-sensitive and tolerant zombi pea (*Vigna vexillata*) reveals energy conservation and root plasticity controlling waterlogging tolerance[J]. Plants, 8: 264-285.

SELTHILVEL S, JAYASHREE B, MAHALAKSHMI V, et al., 2008. Development and mapping of simple sequence repeat markers for pearl millet from date mining of expressed sequence tags[J]. BMC Plant Biol, 8: 119-127.

SHENG WT, DENG JL, RAO YS, et al., 2019. Analysis of SSR information of EST resource in *Capsicum annuum* L.[J]. Mol Plant Breed, 17(14): 4698-4703. [盛文涛，邓建兰，饶友生，等，2019. 辣椒 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 分子植物育种，17(14): 4698-4703.]

TEMNYKH S, DE Clerck G, LUKASHOVA A, et al., 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential[J]. Genome Res, 11(8): 1441-1452.

THIEL T, MICHALEK W, VARSHNEY RK, et al., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Theor Appl Genet, 106: 411-422.

VARSHNEY RK, GRANER A, SORRELLS ME, 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications[J]. Trends Biotechnol, 23(1): 48-55.

WAN XB, LI DX, XU Y, et al., 2017. Development and polymorphism evaluation of EST-SSR markers in Kenaf[J]. Acta Agron Sin, 43(8): 1170-1180. [万雪贝，李东旭，徐益，等，2017. 红麻 EST-SSR 标记的开发及其多态性评价[J]. 作物学报，43(8): 1170-1180.]

WANG L, DOSSA K, YOU J, et al., 2021. High-resolution temporal transcriptome sequencing unravels ERF and WRKY as the master players in the regulatory networks underlying sesame responses to waterlogging and recovery[J]. Genomics, 113(1): 276-290.

WEI BQ, LIU FY, MA ZH, et al., 2013. Distribution characteristics of EST-SSRs and their application on varieties genetic diversity analysis in pepper[J]. Acta Hortic Sin, 40(2): 265-274. [魏兵强，刘飞云，马宗桓，等，2013. 辣椒 EST-SSRs 的分布特征及在品种多样性研究中的应用[J]. 园艺学报，40(2): 265-274.]

WU Y, WANG TT, LI ZX, et al., 2021. Identification of *Chaenomeles* EST-SSR markers and phylogenetic analysis[J]. Plant Physiol J, 57(4): 847-861. [伍越，王甜甜，李泽秀，等，2021. 木瓜转录组数据 SSR 标记的开发及其遗传多样性分析[J]. 植物生理学报，57 (4): 847-861.]

WU ZM, LIU WQ, TANG X, et al., 2012. Development and application of EST-SSR markers in pepper[J]. J S Chin Agric Univ, 33(2): 171-174. [吴智明，刘伟强，唐鑫，等，2012. 辣椒 EST-SSR 标记的开发与应用[J]. 华南农业大学学报，33(2): 171-174.]
XIA MZ, ZHANG Y, YU JY, et al., 2021. Transcriptome analysis for leaves of *Peganum multisectum*[J]. Guihaia, 41(4): 503-513. [夏铭泽，张雨，余静雅，等，2021. 多裂骆驼蓬叶片转录组分析[J]. 广西植物，41(4): 503-513.]
XU XW, CHEN MY, JI J, et al., 2017. Comparative RNA-seq based transcriptome profiling of waterlogging response in cucumber hypocotyls reveals novel insights into the de novo adventitious root primordia initiation[J]. BMC Plant Biol, 17: 129-142.
YAO LH, TENG YW, 2008. A brief introduction on EST-SSR marker and its application in the research of fruit trees[J]. J Fruit Sci, 25(2): 219-224. [姚利华，滕元文，2008. EST-SSR 标记及其在果树研究中的应用[J]. 果树学报，25(2): 219-224.]
YE P, LI XH, TANG JR, et al., 2019. Distribution and characteristics of SSR in transcriptome of *Camellia fascicularis*[J]. J Cent S Univ Technol, 39(9): 86-91. [叶鹏，李显煌，唐军荣，等，2019. 云南金花茶转录组 SSR 的分布及其序列特征[J]. 中南林业科技大学学报，39(9): 86-91.]
YI G, LEE JM, LEE S, et al., 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map[J]. Theor Appl Genet, 114 (1): 113-130.
YUAN C, PENG F, YANG ZM, et al., 2017. EST-SSR identification, markers development of *Ligusticum chuanxiong* based on *Ligusticum chuanxiong* transcriptome sequences[J]. Chin J Chin Mat Med, 42 (17): 3332-3340. [袁灿，彭芳，杨泽茂，等，2017. 川芎转录组 SSR 分析与 EST-SSR 标记的开发[J]. 中国中药杂志，42(17): 3332-3340.]
ZHANG P, LYU DG, JIA LT, et al., 2017. Physiological and de novo transcriptome analysis of the fermentation mechanism of *Cerasus sachalinensis* roots in response to short-term waterlogging[J]. BMC Genomics, 18(1): 649.
ZHANG SM, CHEN C, GONG LY, et al., 2012. Analysis of SSRs information and development o f SSR markers from Phalaenopsis ESTs[J]. Acta Hortic Sin, 39(6): 1191-1198. [张水明，陈程，龚凌燕，等，2012. 蝴蝶兰 EST 资源 SSR 标记分析与开发[J]. 园艺学报，39(6): 1191-1198.]
ZHANG SP, HONG JJ, QIU SL, et al., 2016. Sequencing and analysis of the transcriptome of *Gynura bicolor*[J]. Acta Hortic Sin, 43(5): 935-946. [张少平，洪建基，邱珊莲，等，2016. 紫背天葵高通量转录组测序分析[J]. 园艺学报，43(5): 935-946.]
ZHANG XH, PENG Q, YAN Z, 2022. Transcriptome sequencing analysis of different sweet potato varieties under salt stress[J]. Acta Agron Sin. https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20221017.1428.008.html. [张小红，彭琼，鄢铮，2022. 盐胁迫下不同甘薯品种的转录组测序分析[J]. 作物学报. https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20221017.1428.008.html.]
ZHANG Y, ZHANG XF, CHEN B, et al., 2010. Information and exploitation of EST-SSRs loci in pepper (*Capsicum annuum*)[J]. Acta Agric Boreal-Occident Sin, 19(9): 186-192. [张宇，张晓芬，陈斌，等，2010. 辣椒 EST-SSR 信息分析及标记开发[J]. 西北农业学报，19 (9): 186-192.]
ZHANG ZJ, GUAN Y, YANG L, et al., 2011. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) ESTs[J]. Acta Hortic Sin, 38 (5): 989-996. [张智俊，管雨，杨丽，等，2011. 毛竹 EST 资源 SSR 标记分析与筛选[J]. 园艺学报，38(5): 989-996.]
ZOU XX, MA YQ DAI XZ, et al., 2020. Spread and industry development of pepper in China[J]. Acta Hort Sin, 47(9):1715-1726. [邹学校，马艳青，戴雄泽，等，2020. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报，47(9): 1715-1726.]